

DK/EP

**Oversættelse
vedr. EP patentansøgning/EP patent**

Modtaget

- 3 APR. 2002

Frysingsgebyr:

Ansøgers/fuldmægtigs referencenr: **PVS**

MB/KM/107089

Ansøger (fulde navn og adresse):

Fleere ansøgere på side 2

**Danisco A/S
Langebrogade 1
P.O. Box 17
1001 København K
DK**

Fuldmægtig (navn og adresse):

**BUDDE, SCHOU & OSTENFELD A/S
Vester Søgade 10
DK-1601 København V**

Dansk benævnelse:

**Lipase og anvendelse heraf til forbedring af dej og bagte
produkter.**

Bilagstortegnelse:

- ☒ Dansk oversættelse af krav (T1) i 2 ekspl.
- ☐ Rettet dansk oversættelse af krav (T2) i 2 ekspl.
- ☐ Dansk oversættelse af patent (T3)
- ☐ Dansk oversættelse af ændret patent (T4)
- ☐ Rettet dansk oversættelse af patent (T5)
- ☐ Tegning
- ☐ Foklinsgt

Dato og underskrift:

3. april 2002

BUDDE, SCHOU & OSTENFELD A/S

Chitta Pekren

EP ansøgningsnummer:

01204340.2

EP publiceringsnummer:

1 193 314

EP patentnummer:

Patent- og Varemærkestyrelsen

Helgesøvej Allé 81
DK-2630 Taastrup
Telefon 43 50 80 00
Telefax 43 50 80 01
E-post: pvs@dkpro.dk

DK/EP

NZAS-0155906



BUDDE, SCHOU & OSTENFELD A/S

MB/KM/107089

EP.ANS. 01204340.2
PATENT NR.

KRAVOVERSÆTTELSE

ANSØGER:

Danisco A/S

BENÆVNELSE:

Lipase og anvendelse heraf til forbedring af deje og bagte produkter.

NZAS-0155907

Patentkrav

1. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer
 5 med kort, medium og lang kædelængde; og hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere galactolipider, som normalt er til stede i mel, til de tilsvarende galactosyl-monoglycerider, hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere mindst 10% af de galactosyldiglycerider, som normalt er til stede i en dej indeholdende mel, til monoglycerider.
 10
2. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde, hvori omtalte polypeptid bibeholder mindst 80% aktivitet efter 4 dage ved 20°C, og ved en pH som ligger mellem 3,5-8
 15 inkluderende en pH som ligger mellem 5-7, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere galactolipider, som normalt er til stede i mel, til de tilsvarende galactosylmonoglycerider, hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere mindst 10% af de galactosyldiglycerider, som normalt er til stede i dej indeholdende mel, til monoglycerider.
 20
3. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde, hvori omtalte polypeptid bibeholder mindst 80% aktivitet efter 4 dage ved 20°C, og ved en pH som ligger mellem 3,5-8
 25 inkluderende en pH som ligger mellem 5-7.
4. Et polypeptid med lipaseaktivitet hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde; og hvori omtalte polypeptid er i stand til at
 30 hydrolysere galactolipider, som normalt er til stede i mel, til de tilsvarende galactosyl-monoglycerider.
5. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer
 35 med kort, medium og lang kædelængde, hvori omtalte polypeptid bibeholder mindst 80% aktivitet efter 4 dage ved 20°C og ved en pH som ligger mellem 3,5-8

inkluderende en pH som ligger mellem 5-7, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere galactolipider, som normalt er til stede i mel, til de tilsvarende galactosylmonoglycerider.

- 5 6. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde, hvori omtalte polypeptid ved hydrolyse er i stand til at modificere glycolipiderne, monogalactosyldiglycerid (MGDG) og digalactosyldiglycerid (DGDG) til de mere polære forbindelser monogalactosylmonoglycerid (MGMG) og digalactosylmonoglycerid (DGMG).

7. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde, hvori omtalte polypeptid bibeholder mindst
15 80% aktivitet efter 4 dage ved 20°C og ved en pH som ligger mellem 3,5-8 inkluderende en pH som ligger mellem 5-7, hvori omtalte polypeptid ved hydrolyse er i stand til at modificere glycolipiderne, monogalactosyldiglycerid (MGDG) og digalactosyldiglycerid (DGDG) til de mere polære forbindelser monogalactosylmonoglycerid (MGMG) og digalactosylmonoglycerid (DGMG).

20

8. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde; og hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere galactolipider, som normalt er til stede i mel, til de tilsvarende
25 galactosylmonoglycerider, hvori omtalte polypeptid ved hydrolyse er i stand til at modificere glycolipiderne, monogalactosyldiglycerid (MGDG) og digalactosyldiglycerid (DGDG) til de mere polære forbindelser monogalactosylmonoglycerid (MGMG) og digalactosylmonoglycerid (DGMG).

- 30 9. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde; og hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere galactolipider, som normalt er til stede i mel, til de tilsvarende galactosylmonoglycerider, hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere mindst
35 10% af de galactosyldiglycerider, som normalt er til stede i dej indeholdende mel, til monoglycerider, hvori omtalte polypeptid ved hydrolyse er i stand til at modificere

glycolipiderne, monogalactosyldiglycerid (MGDG) og digalactosyldiglycerid (DGDG) til de mere polære forbindelser monogalactosylmonoglycerid (MGMG) og digalactosylmonoglycerid (DGMG).

5 10. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde, hvori omtalte polypeptid bibeholder mindst 80% aktivitet efter 4 dage ved 20°C, og ved en pH som ligger mellem 3,5-8
inkluderende en pH som ligger mellem 5-7, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at
10 hydrolysere galactolipider, som normalt er til stede i mel, til de tilsvarende galactosylmonoglycerider, hvori omtalte polypeptid ved hydrolyse er i stand til at modificere glycolipiderne, monogalactosyldiglycerid (MGDG) og digalactosyldiglycerid (DGDG) til de mere polære forbindelser monogalactosylmonoglycerid (MGMG) og digalactosylmonoglycerid (DGMG).

15

11. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde, hvori omtalte polypeptid bibeholder mindst 80% aktivitet efter 4 dage ved 20°C, og ved en pH som ligger mellem 3,5-8
inkluderende en pH som ligger mellem 5-7, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at
20 hydrolysere galactolipider, som normalt er til stede i mel, til de tilsvarende galactosylmonoglycerider, hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere mindst 10% af de galactosyldiglycerider, som normalt er til stede i dej indeholdende mel, til monoglycerider, hvori omtalte polypeptid ved hydrolyse er i stand til at modificere
25 glycolipiderne, monogalactosyldiglycerid (MGDG) og digalactosyldiglycerid (DGDG) til de mere polære forbindelser monogalactosylmonoglycerid (MGMG) og digalactosylmonoglycerid (DGMG).

12. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer
30 med kort, medium og lang kædelængde.

13. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid ved hydrolyse er i stand til at modificere glycolipiderne, monogalactosyldiglycerid (MGDG) og
35 digalactosyldiglycerid (DGDG) til de mere polære forbindelser monogalactosylmonoglycerid (MGMG) og digalactosylmonoglycerid (DGMG).

14. Et polypeptid omfattende mindst én aminosyresekvens vist heri som SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 og SEQ ID NO:3.
- 5 15. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvori polypeptidet kan afledes fra *Aspergillus tubigenensis* og/eller hvori, polypeptidet har følgende karakteristika:
- (i) Det bibeholder mindst 80% aktivitet efter 4 dage ved 20°C og ved en pH som
10 ligger mellem 3,5-8,
- (ii) det bibeholder mindst 60% af dets aktivitet efter 1 time ved 60°C i 100 mM natriumacetatbuffer ved pH 5,0, og
- 15 (iii) det har et isoelektrisk punkt som, bestemt ved isoelektrisk fokusering, ligger mellem 3,5-4,5.
16. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, som omfatter mindst én aminosyresekvens udvalgt fra gruppen bestående af
- 20 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 og SEQ ID NO:3, hvor Xaa i omtalte sekvenser er en aminosyre udvalgt fra gruppen bestående af Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr og Val.
17. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav som har enzymatisk
25 aktivitet ved en pH som ligger mellem 3,5-8.
18. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, som bibeholder mindst 80% af dets aktivitet efter en time ved 50°C i 100 mM natriumacetatbuffer ved
30 pH 5,0.
19. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav som, bestemt ved isoelektrisk fokusering, har et isoelektrisk punkt på $4,1 \pm 0,1$.
20. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav som er i stand til at
35 hydrolysere mindst 10% af de galactosyldiglycerider, som normalt er til stede i dej indeholdende mel, til de tilsvarende galactosylmonoglycerider.

21. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav hvori polypeptidet i det væsentlige er på ikke-glycosyleret form.
- 5 22. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav hvori polypeptidet er en del af et fusionsprodukt omfattende yderligere enzymatisk aktive aminosyresekvenser.
23. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav hvori polypeptidet i
10 det væsentlige er på oprenset form.
24. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav hvori polypeptidet har en molekylvægt som, bestemt ved matrix-assisteret laserdesorptions-ioniseringsmassespektrometri (MALDI-MS), er på $31 \pm 1,5$ kDa.
- 15 25. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav hvori polypeptidet omfatter aminosyresekvensen vist som SEQ ID NO:9 eller en variant, homolog eller fragment heraf.
- 20 26. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav hvori polypeptidet ikke omfatter aminosyre(r) som tilvejebringer glycosylerings-site(s).
27. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav hvori polypeptidet er afledt fra en organisme udvalgt fra gruppen bestående af en svamp, gær, bakterie,
25 plantecelle og dyrecelle.
28. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav for hvilket det gælder at det, ved tilsætning af polypeptidet til brøddøj i en mængde på 5.000 LUS pr. kg mel, reducerer den gennemsnitlige porediameter i krummen på brød fremstillet fra
30 denne dej med mindst 10%, i forhold til brød som er fremstillet fra en brøddøj, der ikke er tilsat lipasen.
29. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav for hvilket det gælder at det, når det sættes til en brøddøj i en mængde på 5.000 LUS pr. kg mel,
35 øger porehomoogeniteten af krummen på brød fremstillet fra denne dej med mindst 5%, i forhold til brød som er fremstillet fra brøddøj, der ikke er tilsat lipasen.

30. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav for hvilket det gælder at det, når det sættes til brøddej i en mængde på 5.000 LUS pr. kg mel, øger dejens glutenindeks med mindst 5%, i forhold til dej der ikke er tilsat polypeptidet; glutenindekset bestemmes ved hjælp af et Glutomatic 2200 apparat.

5

31. Et rekombinant DNA-molekyle omfattende en nucleotid-sekvens kodende for polypeptidet ifølge et hvilket som helst af kravene 1-30.

32. Et rekombinant DNA-molekyle ifølge krav 31 omfattende mindst én af SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 og SEQ ID NO:7.

10

33. Et rekombinant DNA-molekyle ifølge krav 31 omfattende SEQ ID NO:8 eller en variant, homolog eller fragment deraf eller en sekvens som er komplementær dertil.

15 34. Et rekombinant DNA-molekyle ifølge krav 31 som koder for et polypeptid som defineret i et hvilket som helst af kravene 1-30, som ikke omfatter aminosyre(r) som tilvejebringer glycosylerings-site(s).

35. Et rekombinant DNA-molekyle ifølge krav 31, som er et plasmid udvalgt fra gruppen bestående af et plasmid deponeret under accessionsnumrene NCIMB 40863, NCIMB 40931, NCIMB 40932, NCIMB 40933, NCIMB 40934 og NCIMB 40935.

20

36. En celle omfattende et rekombinant DNA-molekyle ifølge et hvilket som helst af kravene 31-35 og som er i stand til at udtrykke polypeptidet ifølge et hvilket som helst af kravene 1-30.

25

37. En celle ifølge krav 36 som er en mikroorganisme udvalgt fra gruppen bestående af en svamp, gær, bakterie, plantecelle og dyrecelle.

30 38. En celle ifølge krav 37 som er en filamentøs svamp udvalgt fra gruppen bestående af en *Aspergillus* sp., en *Penicillium* sp., en *Rhizomucor* sp., en *Mucor* Sp., en *Trichoderma* sp., en *Neurospora* sp. og en *Humicola* sp.

39. En celle ifølge krav 38 som er *Aspergillus tubigensis*.

35

40. En fremgangsmåde til fremstilling af et polypeptid ifølge et hvilket som helst af kravene 1-30 omfattende transformation af en værtscelle med et rekombinant DNA-molekyle ifølge et hvilket som helst af kravene 31-39, værtscellen er i stand til at udtrykke nucleotidsekvensen kodende for polypeptidet, dyrkning af den
5 transformerede værtscelle under betingelser, hvor nucleotidsekvensen udtrykkes og opsamling af polypeptidet.

10

41. En fremgangsmåde ifølge krav 40 som omfatter yderligere trin til isolering af polypeptidet på i det væsentlige ren form.

42. En fremgangsmåde til fremstilling af et bagt produkt med forbedret porehomogenitet og reduceret porediameter, fremgangsmåden omfatter tilsætning af polypeptidet ifølge et hvilket som helst af kravene 1-30 eller polypeptidet fremstillet ifølge krav 40 eller 41 til dejen.

15

43. En fremgangsmåde ifølge krav 42, hvori dejen ikke indeholder tilsatte lipider.

44. En fremgangsmåde ifølge krav 42 eller 43, omfattende tilsætning af polypeptidet til dejen, i en mængde som resulterer i mindst 10% reduktion af den gennemsnitlige
20 porediameter i krummen på brød fremstillet fra dejen, i forhold til et brød som er fremstillet fra en brøddøj uden tilsætning af polypeptidet.

45. En fremgangsmåde ifølge krav 42 eller 43, omfattende tilsætning af polypeptidet til dejen, i en mængde som resulterer i mindst 5% stigning i porehomogeniteten i
25 krummen på brød fremstillet fra dejen, i forhold til et brød som er fremstillet fra en brøddøj uden tilsætning af polypeptidet.

46. En fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 42-45, omfattende tilsætning af polypeptidet til dejen, i en mængde som resulterer i mindst 5% stigning i
30 dejen's glutenindeks i forhold til en dej der ikke tilsættes polypeptidet; glutenindekset er bestemt ved hjælp af et Glutomatic 2200 apparat,

47. En fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 42-45, hvori polypeptidet sættes til dejen i en mængde som ligger mellem 100-30.000 lipase units (LUS) pr. kg
35 mel inkluderende en mængde som ligger mellem 500-10.000 lipase units (LUS) pr. kg. mel.

48. En fremgangsmåde ifølge krav 47, hvori en emulgator sættes til dejen.
49. En fremgangsmåde ifølge krav 48, hvori emulgatoren er diacetylvinsyreester af
5 mono- og diglycerider af spiselige fedtsyrer.
50. En fremgangsmåde ifølge krav 49, hvori diacetylvinsyreesteren har en
forsæbningsværdi som ligger mellem 300 og 600 og en syreværdi som ligger mellem
40 og 120.
- 10 51. En fremgangsmåde ifølge krav 50, hvori diacetylvinsyreesteren tilsættes i en
mængde som ligger mellem 0,1-1,0 vægt-% af melet.
52. En fremgangsmåde ifølge krav 42 hvori mindst et yderligere enzym sættes til
15 dejen.
53. En fremgangsmåde ifølge krav 52 hvori det yderligere enzym er udvalgt fra
gruppen bestående af en hemicellulase, en protease, en amylase, en oxidoreduktase
og en cellulase.
- 20 54. Anvendelse af et polypeptid ifølge et hvilket som helst af kravene 1-30 eller et
polypeptid fremstillet ved en proces ifølge krav 40, i en dej til et bagt produkt for at
forbedre stabiliteten af glutenetværket i dejen og/eller for at bibringe forbedret
porehomogenitet og/eller for at reducere porediameteren i det bagte produkt og/eller
25 for at gøre bagte produkter mindre tilbøjelige til at deformeres mekanisk.
55. Anvendelse ifølge krav 54 hvori glutenindekset i dejen er øget med mindst 5% i
forhold til en dej som er fremstillet uden tilsætning af polypeptidet; glutenindekset
bestemmes ved hjælp af et Glutomatic 2200 apparat.
- 30 56. En dejforbedrende sammensætning omfattende polypeptidet ifølge et hvilket som
helst af kravene 1-30 og mindst én yderligere konventionel dej-additiv-bestanddel.
57. En sammensætning ifølge krav 56 hvori den yderligere forbindelse er valgt fra
35 gruppen bestående af et enzym og en emulgator.

58. Et rekombinant DNA-molekyle omfattende en nucleotid-sekvens kodende for et polypeptid udvisende lipaseaktivitet som omfatter mindst én af aminosyresekvenserne vist heri som SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 og SEQ ID NO:3 eller en nucleotid-sekvens kodende for et polypeptid udvisende lipaseaktivitet som omfatter aminosyre-sekvensen vist som SEQ ID NO. 9.

59. Et rekombinant DNA-molekyle omfattende mindst ét af SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 og SEQ ID NO:7 eller i det mindste den kodende sekvens af nucleotid-sekvensen vist som SEQ ID NO:8 eller en variant, homolog eller fragment deraf eller en sekvens der er komplementær dertil.



BUDDE, SCHOU & OSTENFELD A/S

MB/KM/107089

EP.ANS. 01204340.2
PATENT NR.

KRAVOVERSÆTTELSE

ANSØGER:

Danisco A/S

BENÆVNELSE:

Lipase og anvendelse heraf til forbedring af deje og bage produkter.

NZAS-0155917

Patentkrav

1. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde; og hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere galactolipider, som normalt er til stede i mel, til de tilsvarende galactosylmonoglycerider, hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere mindst 10% af de galactosyldiglycerider, som normalt er til stede i en dej indeholdende mel, til monoglycerider.
2. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde, hvori omtalte polypeptid bibeholder mindst 80% aktivitet efter 4 dage ved 20°C, og ved en pH som ligger mellem 3,5-8 inkluderende en pH som ligger mellem 5-7, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere galactolipider, som normalt er til stede i mel, til de tilsvarende galactosylmonoglycerider, hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere mindst 10% af de galactosyldiglycerider, som normalt er til stede i dej indeholdende mel, til monoglycerider.
3. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde, hvori omtalte polypeptid bibeholder mindst 80% aktivitet efter 4 dage ved 20°C, og ved en pH som ligger mellem 3,5-8 inkluderende en pH som ligger mellem 5-7.
4. Et polypeptid med lipaseaktivitet hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde; og hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere galactolipider, som normalt er til stede i mel, til de tilsvarende galactosylmonoglycerider.
5. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde, hvori omtalte polypeptid bibeholder mindst 80% aktivitet efter 4 dage ved 20°C og ved en pH som ligger mellem 3,5-8

inkluderende en pH som ligger mellem 5-7, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere galactolipider, som normalt er til stede i mel, til de tilsvarende galactosylmonoglycerider.

- 5 6. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde, hvori omtalte polypeptid ved hydrolyse er i stand til at modificere glycolipiderne, monogalactosyldiglycerid (MGDG) og digalactosyldiglycerid (DGDG) til de mere polære forbindelser monogalactosylmonoglycerid (MGMG) og digalactosylmonoglycerid (DGMG).

7. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde, hvori omtalte polypeptid bibeholder mindst 15 80% aktivitet efter 4 dage ved 20°C og ved en pH som ligger mellem 3,5-8 inkluderende en pH som ligger mellem 5-7, hvori omtalte polypeptid ved hydrolyse er i stand til at modificere glycolipiderne, monogalactosyldiglycerid (MGDG) og digalactosyldiglycerid (DGDG) til de mere polære forbindelser monogalactosylmonoglycerid (MGMG) og digalactosylmonoglycerid (DGMG).

- 20 8. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde; og hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere galactolipider, som normalt er til stede i mel, til de tilsvarende galactosylmonoglycerider, hvori omtalte polypeptid ved hydrolyse er i stand til at 25 modificere glycolipiderne, monogalactosyldiglycerid (MGDG) og digalactosyldiglycerid (DGDG) til de mere polære forbindelser monogalactosylmonoglycerid (MGMG) og digalactosylmonoglycerid (DGMG).

- 30 9. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde; og hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere galactolipider, som normalt er til stede i mel, til de tilsvarende galactosylmonoglycerider, hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere mindst 35 10% af de galactosyldiglycerider, som normalt er til stede i dej indeholdende mel, til monoglycerider, hvori omtalte polypeptid ved hydrolyse er i stand til at modificere

glycolipiderne, monogalactosyldiglycerid (MGDG) og digalactosyldiglycerid (DGDG) til de mere polære forbindelser monogalactosylmonoglycerid (MGMG) og digalactosylmonoglycerid (DGMG).

- 5 10. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde, hvori omtalte polypeptid bibeholder mindst 80% aktivitet efter 4 dage ved 20°C, og ved en pH som ligger mellem 3,5-8 inkluderende en pH som ligger mellem 5-7, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at
- 10 hydrolysere galactolipider, som normalt er til stede i mel, til de tilsvarende galactosylmonoglycerider. hvori omtalte polypeptid ved hydrolyse er i stand til at modificere glycolipiderne, monogalactosyldiglycerid (MGDG) og digalactosyldiglycerid (DGDG) til de mere polære forbindelser monogalactosylmonoglycerid (MGMG) og digalactosylmonoglycerid (DGMG).

15

11. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde, hvori omtalte polypeptid bibeholder mindst 80% aktivitet efter 4 dage ved 20°C, og ved en pH som ligger mellem 3,5-8
- 20 inkluderende en pH som ligger mellem 5-7, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere galactolipider, som normalt er til stede i mel, til de tilsvarende galactosylmonoglycerider, hvori omtalte polypeptid er i stand til at hydrolysere mindst 10% af de galactosyldiglycerider, som normalt er til stede i dej indeholdende mel, til monoglycerider, hvori omtalte polypeptid ved hydrolyse er i stand til at modificere
- 25 glycolipiderne, monogalactosyldiglycerid (MGDG) og digalactosyldiglycerid (DGDG) til de mere polære forbindelser monogalactosylmonoglycerid (MGMG) og digalactosylmonoglycerid (DGMG).

12. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid er et triacylglycerol-hydrolyserende enzym, og hvori omtalte polypeptid er i stand til at fraspalte fedtsyrer med kort, medium og lang kædelængde.
- 30

13. Et polypeptid med lipaseaktivitet; hvori omtalte polypeptid ved hydrolyse er i stand til at modificere glycolipiderne, monogalactosyldiglycerid (MGDG) og
- 35 digalactosyldiglycerid (DGDG) til de mere polære forbindelser monogalactosylmonoglycerid (MGMG) og digalactosylmonoglycerid (DGMG).

14. Et polypeptid omfattende mindst én aminosyresekvens vist heri som SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 og SEQ ID NO:3.
- 5 15. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvori polypeptidet kan afledes fra *Aspergillus tubigensis* og/eller hvori, polypeptidet har følgende karakteristika:
- 10 (i) Det bibeholder mindst 80% aktivitet efter 4 dage ved 20°C og ved en pH som ligger mellem 3,5-8,
- (ii) det bibeholder mindst 60% af dets aktivitet efter 1 time ved 60°C i 100 mM natriumacetatbuffer ved pH 5,0, og
- 15 (iii) det har et isoelektrisk punkt som, bestemt ved isoelektrisk fokusering, ligger mellem 3,5-4,5.
16. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, som omfatter mindst én aminosyresekvens udvalgt fra gruppen bestående af
- 20 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 og SEQ ID NO:3, hvor Xaa i omtalte sekvenser er en aminosyre udvalgt fra gruppen bestående af Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr og Val.
17. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav som har enzymatisk
- 25 aktivitet ved en pH som ligger mellem 3,5-8.
18. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, som bibeholder mindst 80% af dets aktivitet efter en time ved 50°C i 100 mM natriumacetatbuffer ved pH 5,0.
- 30 19. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav som, bestemt ved isoelektrisk fokusering, har et isoelektrisk punkt på $4,1 \pm 0,1$.
20. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav som er i stand til at
- 35 hydrolysere mindst 10% af de galactosyldiglycerider, som normalt er til stede i dej indeholdende mel, til de tilsvarende galactosylmonoglycerider.

21. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav hvori polypeptidet i det væsentlige er på ikke-glycosyleret form.
- 5 22. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav hvori polypeptidet er en del af et fusionsprodukt omfattende yderligere enzymatisk aktive aminosyresekvenser.
23. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav hvori polypeptidet i
10 det væsentlige er på oprenset form.
24. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav hvori polypeptidet har en molekylvægt som, bestemt ved matrix-assisteret laserdesorptions-ioniserings-massespektrometri (MALDI-MS), er på $31 \pm 1,5$ kDa.
- 15 25. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav hvori polypeptidet omfatter aminosyresekvensen vist som SEQ ID NO:9 eller en variant, homolog eller fragment heraf.
- 20 26. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav hvori polypeptidet ikke omfatter aminosyre(r) som tilvejebringer glycosylerings-site(s).
27. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav hvori polypeptidet er afledt fra en organisme udvalgt fra gruppen bestående af en svamp, gær, bakterie,
25 plantecelle og dyrecelle.
28. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav for hvilket det gælder at det, ved tilsætning af polypeptidet til brøddøj i en mængde på 5.000 LUS pr. kg mel, reducerer den gennemsnitlige porediameter i krummen på brød fremstillet fra
30 denne dej med mindst 10%, i forhold til brød som er fremstillet fra en brøddøj, der ikke er tilsat lipasen.
29. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav for hvilket det gælder at det, når det sættes til en brøddøj i en mængde på 5.000 LUS pr. kg mel,
35 øger porehomogeniteten af krummen på brød fremstillet fra denne dej med mindst 5%, i forhold til brød som er fremstillet fra brøddøj, der ikke er tilsat lipasen.

30. Et polypeptid ifølge et hvilket som helst af de foregående krav for hvilket det gælder at det, når det sættes til brøddej i en mængde på 5.000 LUS pr. kg mel, øger dejens glutenindeks med mindst 5%, i forhold til dej der ikke er tilsat polypeptidet: glutenindekset bestemmes ved hjælp af et Glutomatic 2200 apparat.

5

31. Et rekombinant DNA-molekyle omfattende en nucleotid-sekvens kodende for polypeptidet ifølge et hvilket som helst af kravene 1-30.

32. Et rekombinant DNA-molekyle ifølge krav 31 omfattende mindst én af SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 og SEQ ID NO:7.

33. Et rekombinant DNA-molekyle ifølge krav 31 omfattende SEQ ID NO:8 eller en variant, homolog eller fragment deraf eller en sekvens som er komplementær dertil.

34. Et rekombinant DNA-molekyle ifølge krav 31 som koder for et polypeptid som defineret i et hvilket som helst af kravene 1-30, som ikke omfatter aminosyre(r) som tilvejebringer glycosylerings-site(s).

35. Et rekombinant DNA-molekyle ifølge krav 31, som er et plasmid udvalgt fra gruppen bestående af et plasmid deponeret under accessionsnumrene NCIMB 40863, NCIMB 40931, NCIMB 40932, NCIMB 40933, NCIMB 40934 og NCIMB 40935.

36. En celle omfattende et rekombinant DNA-molekyle ifølge et hvilket som helst af kravene 31-35 og som er i stand til at udtrykke polypeptidet ifølge et hvilket som helst af kravene 1-30.

37. En celle ifølge krav 36 som er en mikroorganisme udvalgt fra gruppen bestående af en svamp, gær, bakterie, plantecelle og dyrecelle.

38. En celle ifølge krav 37 som er en filamentøs svamp udvalgt fra gruppen bestående af en *Aspergillus* sp., en *Penicillium* sp., en *Rhizomucor* sp., en *Mucor* Sp., en *Trichoderma* sp., en *Neurospora* sp. og en *Humicola* sp.

39. En celle ifølge krav 38 som er *Aspergillus tubigensis*.

35

40. En fremgangsmåde til fremstilling af et polypeptid ifølge et hvilket som helst af kravene 1-30 omfattende transformation af en værtscelle med et rekombinant DNA-molekyle ifølge et hvilket som helst af kravene 31-39, værtscellen er i stand til at udtrykke nucleotidsekvensen kodende for polypeptidet, dyrkning af den transformerede værtscelle under betingelser, hvor nucleotidsekvensen udtrykkes og opsamling af polypeptidet.

41 En fremgangsmåde ifølge krav 40 som omfatter yderligere trin til isolering af polypeptidet på i det væsentlige ren form.

10

42. En fremgangsmåde til fremstilling af et bagt produkt med forbedret porehomogenitet og reduceret porediameter, fremgangsmåden omfatter tilsætning af polypeptidet ifølge et hvilket som helst af kravene 1-30 eller polypeptidet fremstillet ifølge krav 40 eller 41 til dejen.

15

43. En fremgangsmåde ifølge krav 42, hvori dejen ikke indeholder tilsatte lipider.

44. En fremgangsmåde ifølge krav 42 eller 43, omfattende tilsætning af polypeptidet til dejen, i en mængde som resulterer i mindst 10% reduktion af den gennemsnitlige porediameter i krummen på brød fremstillet fra dejen, i forhold til et brød som er fremstillet fra en brøddøj uden tilsætning af polypeptidet.

20

45. En fremgangsmåde ifølge krav 42 eller 43, omfattende tilsætning af polypeptidet til dejen, i en mængde som resulterer i mindst 5% stigning i porehomogeniteten i krummen på brød fremstillet fra dejen, i forhold til et brød som er fremstillet fra en brøddøj uden tilsætning af polypeptidet.

25

46. En fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 42-45, omfattende tilsætning af polypeptidet til dejen, i en mængde som resulterer i mindst 5% stigning i dejens glutenindeks i forhold til en dej der ikke tilsættes polypeptidet; glutenindekset er bestemt ved hjælp af et Glutomatic 2200 apparat.

30

47. En fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 42-45, hvori polypeptidet sættes til dejen i en mængde som ligger mellem 100-30.000 lipase units (LUS) pr. kg mel inkluderende en mængde som ligger mellem 500-10.000 lipase units (LUS) pr. kg mel.

35

48. En fremgangsmåde ifølge krav 47, hvori en emulgator sættes til dejen.
49. En fremgangsmåde ifølge krav 48, hvori emulgatoren er diacetylvinsyreester af
5 mono- og diglycerider af spiselige fedtsyrer.
50. En fremgangsmåde ifølge krav 49, hvori diacetylvinsyreesteren har en
forsæbningsværdi som ligger mellem 300 og 600 og en syreværdi som ligger mellem
40 og 120.
- 10 51. En fremgangsmåde ifølge krav 50, hvori diacetylvinsyreesteren tilsættes i en
mængde som ligger mellem 0,1-1,0 vægt-% af melet.
52. En fremgangsmåde ifølge krav 42 hvori mindst et yderligere enzym sættes til
15 dejen.
53. En fremgangsmåde ifølge krav 52 hvori det yderligere enzym er udvalgt fra
gruppen bestående af en hemicellulase, en protease, en amylase, en oxidoreduktase
og en cellulase.
- 20 54. Anvendelse af et polypeptid ifølge et hvilket som helst af kravene 1-30 eller et
polypeptid fremstillet ved en proces ifølge krav 40, i en dej til et bagt produkt for at
forbedre stabiliteten af glutenetværket i dejen og/eller for at bibringe forbedret
porehomogenitet og/eller for at reducere porediameteren i det bagte produkt og/eller
25 for at gøre bagte produkter mindre tilbøjelige til at deformeres mekanisk.
55. Anvendelse ifølge krav 54 hvori glutenindekset i dejen er øget med mindst 5% i
forhold til en dej som er fremstillet uden tilsætning af polypeptidet; glutenindekset
bestemmes ved hjælp af et Glutomatic 2200 apparat.
- 30 56. En dejforbedrende sammensætning omfattende polypeptidet ifølge et hvilket som
helst af kravene 1-30 og mindst én yderligere konventionel dej-additiv-bestanddel.
57. En sammensætning ifølge krav 56 hvori den yderligere forbindelse er valgt fra
35 gruppen bestående af et enzym og en emulgator.

58. Et rekombinant DNA-molekyle omfattende en nucleotid-sekvens kodende for et polypeptid udvisende lipaseaktivitet som omfatter mindst én af aminosyresekvenserne vist heri som SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 og SEQ ID NO:3 eller en nucleotid-sekvens kodende for et polypeptid udvisende lipaseaktivitet som omfatter aminosyre-sekvensen vist som SEQ ID NO. 9.

59. Et rekombinant DNA-molekyle omfattende mindst ét af SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 og SEQ ID NO:7 eller i det mindste den kodende sekvens af nucleotid-sekvensen vist som SEQ ID NO:8 eller en variant, homolog eller fragment deraf eller en sekvens der er komplementær dertil.